

Reinheitskontrolle von Marzipan: Bestimmung von Süß- und Bittermandelsorten durch Vergleich extrachromosomaler Genomsequenzen (Plastiden) sowie eine darauf basierte Quantifizierung von bitteren Mandelsorten in Marzipan



Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle(n):	Universität Hamburg Hamburg School of Food Science Institut für Lebensmittelchemie Arbeitskreis Prof. Dr. Markus Fischer Prof. Dr. Markus Fischer/M.Sc. Nils Neumann
Industriegruppe(n):	Bundesverband der Deutschen Süßwarenindustrie e.V. (BDSI), Bonn
Projektkoordinator:	Dr. Frank Heckel Lebensmittelchemisches Institut des Bundesverbandes der Deutschen Süßwarenindustrie e.V. (BDSI), Köln
Laufzeit:	2017 - 2020
Zuwendungssumme:	€ 278.660,--

Ausgangssituation

Bei der Herstellung von Marzipan werden neben süßen Mandeln (*Prunus dulcis* var. *dulcis*) auch bittere Mandeln (*Prunus dulcis* var. *amara*) eingesetzt, um dem Marzipan eine besondere sensorische Note zu verleihen. Süßmandeln sind die entscheidende und wertgebende Zutat in Marzipan.

Die Hersteller der deutschen Rohmassenindustrie setzten 2015 rund 19.000 Tonnen Marzipanrohmasse sowie 9.000 Tonnen angewirkte Marzipanmasse am deutschen Markt ab. Die Hersteller richten sich dabei bei der Herstellung von Marzipan nach den Leitsätzen für Ölsamen und daraus hergestellte Massen und Süßwaren. Der Anteil an bitteren Mandeln in Marzipan ist in den Leitsätzen auf 12 Gew. % beschränkt. Die Zugabe von entbitterten Bittermandeln ist hierbei nicht erlaubt, wird aber praktiziert.

Um die Süßwarenindustrie vor Verfälschungen der Rohware zu schützen und die Sortenreinheit der Produkte überprüfen zu können, werden deshalb zuverlässige Methoden benötigt. Der charakteristische Blausäure- oder Benzaldehydgehalt in Bittermandeln kann dabei zur Quantifizierung nicht herangezogen werden, da beide Verbindungen leicht flüchtig sind und in verarbeiteten Rohmassen dadurch schnell abgereichert werden. Ebenso ist eine visuelle Unterscheidung der Mandelsorten in Marzipanrohmassen nicht gegeben und damit auch eine genaue Beurteilung des Bittermandelanteils in Marzipanrohmassen nicht möglich. Da das genetische Profil der Rohstoffe (Mandeln) von exogenen Einflüssen nicht beeinflusst wird, können aber mögliche Sequenzunterschiede als Grundlage zur Unterscheidung der Mandelsorten dienen.

Ziel des Forschungsvorhabens war die Entwicklung von molekularbiologischen Methoden, die es ermöglichen, Verfälschungen von Marzipanrohmassen mit bitteren bzw. ggf. entbitterten Mandeln aufzudecken. Die entsprechenden Methoden sollen bewusste Verfälschungen von Mandeln und Marzipanrohmassen qualitativ und quantitativ nachweisen können.

Forschungsergebnis

Die im Rahmen des Forschungsvorhabens durchgeführten Non-targeted-Methoden ermöglichen eine Sortenbestimmung auf Basis von Blattmaterial. Die Süßmandelsorten Marcona, Larguetta, Ferragnes, Carmel, Nonpareil und Monterey konnten mit drei Primerpaaren durch die Analyse der Mikrosatelliten des Blattmaterials unterschieden werden. Ebenso konnten mittels RAPD-PCR-Technik (Randomly-Amplified-Polymorphic-DNA) erfolgreich Mandelblätter der Sorten Marcona, Larguetta, Ferragnes, Nonpareil und Monterey klassifiziert werden. Weiterhin zeigten die Non-targeted-Methoden unterschiedliche Ergebnisse bei Blatt- und Kernmaterial. Das Kerngenom des Mandelkerns besteht sowohl aus dem Erbgut von Baum (maternal) und Pollen (paternal) und zeigt bei den durchgeführten Non-targeted-Methoden den Einfluss beider „Elternteile“. Der Einfluss des Pollens kann allerdings nicht sortenrein zugeordnet werden und verhindert eine sichere Sortenbestimmung bei Mandelkernen. Die Ergebnisse der Non-targeted-Methoden können trotzdem Verwendung in der Genotypisierung von Mandelbäumen finden und somit zur Steuerung von Züchtungsprogrammen beitragen.

Die Ergebnisse des Targeted-Ansatzes waren indes zielführender in Bezug auf die Qualifizierung und Quantifizierung der Bittermandelsorten in Marzipan. Für eine Sortenunterscheidung bei Mandelkernen und deren weiterverarbeiteten Lebensmitteln kann auf maternale Sequenzen, wie das Chloroplasten-Genom (cpDNA), zurückgegriffen werden. Um möglichst viele plastidäre Sequenzen beim Sequenzieren zu erhalten, war eine Anreicherung der cpDNA notwendig. Die durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass mittels Dichtegradientenzentrifugation unter Zuhilfenahme einer Ultrazentrifuge die Chloroplasten-DNA angereichert werden konnte, die Anreicherung durch das NEBNext-Microbiome-DANN-Enrichment-Kit verlief allerdings erfolgreicher. Die Auswertung der durch neueste Sequenzierverfahren (Next-Generation-Sequencing, NGS) ermittelte Basenabfolge (Sequenz) ergab, dass Unterschiede auf dem Chloroplasten-Genom der Süß- und Bittermandelsorten vorhanden sind. Bisher konnte ein Einzelbasenaustausch durch die Analyse des Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) in iranischen Bittermandelkernen nachgewiesen werden. Die durch einen enzymatischen Verdau entstandenen spezifischen DNA-Fragmente der iranischen Bittermandel und der Süßmandel Carmel konnten über eine Agarosegelelektrophorese sowie Kapillargelelektrophorese in ersten Anläufen sowohl semiquantitativ als auch quantitativ in Mandel- und Marzipan-DNA Mischungen bestimmt werden. Es ist vorgesehen, die Methode weiter zu optimieren, um ihre Zuverlässigkeit und Aussagekraft zu erhöhen. Durch Validierung der verbleibenden Sequenzvariationen soll zudem getestet werden, ob Bittermandeln anderer Herkunftsländer ebenfalls auf Basis des Chloroplasten-Genoms von Süßmandelsorten differenziert werden können.

Wirtschaftliche Bedeutung

Mandeln sind ein wichtiger Rohstoff für die Süßwarenindustrie. Süße Mandeln werden überwiegend aus Kalifornien/USA bezogen. Im Gegensatz zu Importen aus den USA enthalten europäische Mandeln aus dem Mittelmeergebiet regelmäßig Anteile an bitteren Mandeln, die zumeist kostengünstiger als süße Mandeln sind. So kosteten Bittermandeln im Zeitraum 2007-2015 etwa 4 €/kg, Süßmandeln zwischen 2014-2015 etwa 7,3 €/kg.

Unabhängig von der Konzentration cyanogener Gycoside kann mit den Ergebnissen des Vorhabens verhindert werden, dass durch eine überhöhte Beimischung von bitteren Mandeln (> 4 %) ungerechtfertigte wirtschaftliche Vorteile entstehen, gleichzeitig können die Anforderungen der Leitsätze für Ölsaaten überprüft werden.

Der deutschen Süßwarenindustrie standen bislang keine objektiven Verfahren für eine Quantifizierung des Bittermandelanteils in Chargen von Süßmandeln und Marzipanrohmassen zur Verfügung. Eine entsprechende Analytik-basierte Spezifikation verbessert deshalb die Wettbewerbsfähigkeit der deutschen Rohmassehersteller gegenüber internationalen Mitbewerbern, die i.d.R. nur sensorische Methoden anwenden. Allgemein zeigt die im Vorhaben verwendete molekularbiologische Nachweismethode der RFLP Vorteile gegenüber sensorischen Methoden zur Bestimmung des Bittermandelanteils in Marzipanrohmassen, weil sie auf dem genetischen Profil der Mandel basiert. Die RFLP und die Messung mittels Bioanalyser sind standardisier-

bar. Die Methode ist in jedem molekularbiologisch ausgerichteten Dienstleistungslabor durchführbar und kann auch von technischem Personal durchgeführt werden. Dadurch ist sichergestellt, dass die neue Methode in die Routineanalytik überführt werden kann. Die getestete Nachweismethode kann zur Authentizitätsprüfung von Rohmassen genutzt werden und ist damit in der Lage, die verarbeitende Industrie und Händler vor Betrug durch Zulieferer zu schützen. Eine Weiterentwicklung der getesteten Nachweismethode bis zur Marktreife sowie die Ausweitung zur Detektion weiterer Bittermandelsorten ist zu erwarten.

Publikationen (Auswahl)

1. FEI-Schlussbericht 2020.
2. Wax, N., Voges, L. F., Wenck, S. H., Herold, J. L., Seifert, S. & Fischer, M.: Detection of almond adulteration by genotyping of sweet and bitter almonds (*Prunus dulcis*) with double-mismatch allele-specific qPCR (DMAS-qPCR). In Druck (2022).
3. Wax, N., La-Rostami, F., Albert, C. & Fischer, M.: Food Fraud: Development of a powerful CRISPR DETECTR screening method for SNP detection. In Druck (2022).
4. Wax, N., Arndt, M., Schmidt, C., Knapphengst, B. & Fischer, M.: Prediction of amygdalin in almonds via near-infrared spectroscopy on a worldwide scale. In Druck (2022).
5. Neumann, N. & Fischer, M.: Genetic Profiling von Süß- und Bittermandelsorten zur Quantifizierung des Bittermandelgehalts in Marzipan. FOOD-Lab 2, 22-26 (2020).

Weiteres Informationsmaterial

Universität Hamburg
Hamburg School of Food Science
Institut für Lebensmittelchemie
Arbeitskreis Prof. Dr. Markus Fischer
Grindelallee 117, 20146 Hamburg
Tel.: +49 40 42838-4359
Fax: +49 40 42838-4342
E-Mail: markus.fischer@chemie.uni-hamburg.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 125, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

Förderhinweis

... ein Projekt der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)

Gefördert durch:



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 125, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.